Ueber die asymmetrische und symmetrische Einwirkung der Hefe auf racemische Aminosäuren.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der hohen

philosophischen Fakultät der Kgl. Universität Breslau

eingereicht

ACAD. LUGD. BAT. BIBL.

und mit ihrer Genehmigung veröffentlicht

von

Loser Zamkow.

Montag, den 27. Februar 1911, Mittags 12½ Uhr

im Musiksaal der Universität:

Vortrag:

„Über die alkoholische Gärung des Eiweisses"

und

Promotion.

Breslau
Buchdruckerei H. Fleischmann.
1911.

Gedruckt mit Genehmigung der hohen philosophischen Fakultät der Kgl. Universität Breslau.

Referent: Geheimrat Prof. Dr. **E. Buchner**.

Bei dem künstlichen Aufbau von Substanzen mit asymmetrischem Kohlenstoffatom aus symmetrisch konstituierten Verbindungen werden im allgemeinen nur inaktive Produkte erhalten, die aus gleichen Teilen der rechts- und linksdrehenden Modifikation bestehen, also racemisch sind. In wesentlich anderer Richtung verläuft dieser synthetische Prozess in der Natur. Wo wir nämlich natürliche Substanzen mit asymmetrischem Kohlenstoffatom antreffen, sind diese stets optisch aktiv und zwar zeigen sie immer eine ganz bestimmte Drehungsrichtung nach rechts oder nach links.

Nur ganz vereinzelte Ausnahmen von dieser Regel sind bisher mit Sicherheit bekannt geworden. Hierzu gehört z. B. das in den Pflanzen weit verbreitete Asparagin, das vorwiegend in der linksdrehenden Modifikation, nebenher aber, wenn auch in wesentlich geringerer Menge, in Form der rechtsdrehenden Verbindung zu finden, und mitunter sogar, wie Piutti[1]) nach Pasteurs Beispiel gezeigt hat, von seinem Antipoden durch Auslese zu trennen ist. Derartige Ausnahmen, wie das Asparagin, liessen sich vielleicht in grösserer Anzahl anführen, doch ist nur in den wenigsten Fällen klar ersichtlich, ob die hin und wieder beobachtete niedrigere Drehung der aus natürlichen Produkten isolierten Körper wirklich auf die Anwesenheit des Antipoden oder nicht vielmehr auf die mangelnde chemische Reinheit der betreffenden Verbindungen oder ihre leichte Razemisierbarkeit zurückzuführen ist. Als

[1]) Jahrb. f. Chem. **1886**,1343; **1887**,1660.

sicherer Befund unter diesen Beispielen ist eigentlich nur die Milchsäure[1]) anzusehen, die in allen 3 Modifikationen als rechtsdrehende, linksdrehende und auch in der Racemform das Gärungsprodukt bestimmter Bakterien bildet. besonders erwähnungswert in dieser Richtung ist ferner die bei einer bestimmten Stoffwechselkrankheit auftretende Harnpentose, die sich im Gegensatz zu allen bisher im menschlichen und thierischen Organismus aufgefundenen, asymmetrisch gebauten Substanzen, als optisch inaktiv, nämlich als die racemische Arabinose erwiesen hat[2]). Im Pflanzenreich dürfte zu derartigen Verbindungen nur noch die racemische Galactose zu rechnen sein, die Winterstein[3]) aus Chagualgummi und Tollens und Oshima[4]) aus japanischem Nori isolieren konnten.

Die eigenartige Erscheinung, dass in der Natur optisch aktive Substanzen fast ausschliesslich nur in einer Drehungsrichtung auftreten, findet ihre Erklärung darin, dass die Erzeuger der Lebensvorgänge — die Enzyme — vermutlich selbst in bestimmter Weise asymmetrisch gebaut sind, und dass deshalb auch ihre Produkte entsprechend einseitige stereochemische Configuration besitzen müssen. Für eine derartige Anschauung hat sich wenigstens rein chemisch dadurch ein Beweis erbringen lassen, dass es gelingt, die Synthese einer asymmetrisch gebauten Substanz aus einer symmetrisch gebauten durch vorübergehende Einführung einer optisch aktiven Verbindung in der Weise zu beeinflussen, dass vorwiegend nur eine optisch aktive Modifikation entsteht. Eine solche asymmetrische Synthese, wie Emil Fischer[5]) diesen Vorgang bezeichnet hat, ist zum ersten Mal

---

[1]) Beilstein, 1,558; Erg. 1,223.
[2]) C. Neuberg, Ber. **33**, 2243 (1900)
[3]) Ber. **31**,1571 (1898)
[4]) Ber. **34**,1422 (1901)
[5]) E. Fischer u. M. Slimmer. Ber. **36**,2 (1903).

praktisch von W. Marckwald[1]) durchgeführt worden. Er ging dabei aus von der inaktiven Äthyl-Methyl-Malonsäure, deren Brucinsalz er zur Abspaltung von Kohlensäure über den Schmelzpunkt erhitzte. Bei der Zerlegung des Salzes resultierte dann optisch aktive d-Valeriansäure. Noch näher den natürlichen Vorgängen steht die asymmetrische Synthese, die neuerdings Rosenthaler[2]) mit Hilfe des Enzyms Emulsin durchführen konnte, indem er dieses auf Benzaldehyd und Blausäure einwirken liess und dabei durch Verseifung des zuerst entstandenen Nitrils optisch aktive Mandelsäure erhielt.

Der eigentümliche stereochemische Bau der im Pflanzen- und Tierkörper enthaltenen Enzyme erklärt die Befähigung der Organismen, den Racemkörper einer optisch-aktiven Verbindung oder das Gemisch der beiden Stereoisomeren derartig zu zerlegen, dass vorwiegend nur die eine Komponente durch Ab- oder Aufbau angegriffen und zerstört wird, während die andere im wesentlichen erhalten bleibt. Dabei hat sich stets gezeigt, dass das bevorzugte Angriffsobjekt der Organismen regelmässig die natürlich vorkommende Komponente bildet, dass dagegen der in der Natur nicht vorkommende Antipode für die Assimilation weniger ausgenutzt wird und infolgedessen der Hauptsache nach unversehrt zurückbleibt.

Diese Erscheinung hat zuerst Pasteur beobachtet und darauf die so genannte „biologische Spaltungsmethode“ der racemischen Verbindungen begründet. In ihrer ursprünglichen Form bestand diese Methode darin, dass man irgend einen Mikroorganismus in einer mit Nährsalzen versehenen Lösung der betreffenden Racemverbindung züchtete und nach längerer Einwirkung den durch das Wachstum nicht angegriffenen optisch-aktiven Bestandteil aus der Lösung isolierte. Auf diese Weise gelang es Pasteur[3]) zum ersten Mal aus einer Lösung

[1]) Ber. **37**,349 (1904).
[2]) Biochem. Ztschr. **14**,238 (1908); **17**,257 (1909); **19**,186 (1909).
[3]) Comptes rend. de l'Ac. **46**,615 (1858): **51**,298 (1860).

von Ammoniumracemat nach Aussaat von niederen Pilzen, besonders von Penicillium glaucum Links-Weinsäure zu erhalten.

An diese Beobachtung Pasteurs schloss sich späterhin eine grosse Zahl von mehr oder minder erfolgreichen Spaltungsversuchen an verschiedenartigsten Substanzen mit Hilfe einer ganzen Reihe von Mikroorganismen, wie Hefen, Schimmel- und Spaltpilzen etc. Von racemischen Säuren, die man durch Pilzgärung aktivieren konnte, sind ausser der von Pasteur gespaltenen Traubensäure noch zu erwähnen die Milchsäure[1]), Glycerinsäure[2]) und Mandelsäure[3]). Aus zahlreichen Versuchen, die ferner Mac Kenzie u. Harden in dieser Richtung anstellten, ergab sich allgemein, dass die inaktiven Säuren bezüglich ihrer Komponenten verschieden angegriffen werden, und dass der Grad der Spaltung von der Differenz zwischen den Angriffsgeschwindigkeiten abhängig ist[4]). Daraus folgt also die wichtige Tatsache, dass nicht, wie Pasteur ursprünglich annahm, nur eine einzige Komponente ausschliesslich der Einwirkung der Pilze unterliegt, sondern auch die andere, wenn auch in viel geringerem Masse.

Von grosser Bedeutung für die Kenntnis der Stereoisomerie der Kohlehydrate waren die von E. Fischer durchgeführten Vergärungen von racemischer Glucose, Mannose, Lävulose und Galaktose mittels Bierhefe, wobei stets die natürlich vorkommende d-Form angegriffen wurde, während die l-Form im wesentlichen intakt blieb. Aus diesen Versuchen ging mit besonderer Deutlichkeit

---

[1]) J. Lewkowitsch, Ber. **16**,2721 (1883); Mac Kenzie u. Harden, Proc. chem. Soc. 19,48 (1903).

[2]) J. Lewkowitsch, Ber. **16**,2721 (1883); Frankland u. Frew, Chem. Soc. **59**,96 (1891.)

[3]) J. Lewkowitsch, Ber. **15**,1505 (1882); Ber. **16**,1568 1883). Mac Kenzie u. Harden, a. a. O.

[4]) O. Emmerling in Lafars Handbuch der Technischen Mycologie, 2. Aufl. 1. Bd. 4 Abschn. 15. Kap.

hervor, dass zwischen den Enzymen und den von ihnen angegriffenen Substanzen bestimmte Beziehungen hinsichtlich der Konfiguration der Moleküle obwalten müssen, die Fischer durch den Vergleich mit dem Bilde des zu dem Schloss passenden Schlüssels gekennzeichnet hat.

Ähnlich wie für die Mikroorganismen, liess sich dann weiterhin nachweisen, dass auch der menschliche und tierische Organismus befähigt ist, racemische Zuckerarten asymmetrisch abzubauen, wie das Beispiel der Zerlegung der inaktiven Arabinose und Mannose gezeigt hat[1]). Alle diese Spaltungsversuche sind hauptsächlich vorgenommen an Racemverbindungen von Substanzen, die in natürlichen Produkten vorkommen und einen Nährwert für die betreffenden Organismen besitzen. In dieser Hinsicht waren gerade die Versuche mit Kohlehydraten von hervorragendem physiologischem Interesse, da diese einen wesentlichen Bestandteil der pflanzlichen und tierischen Nährstoffe bilden.

Von noch grösserer Bedeutung für die Ernährung sind bekanntlich die stickstoffhaltigen Verbindungen, die mit dem Namen Eiweissstoffe oder Proteine bezeichnet werden. Die wichtige Frage, wie sich diese chemischen Gebilde, besonders ihre Abbauprodukte, die Aminosäuren, im Stoffwechselprozess der Organismen verhalten, hat die Physiologen und Chemiker bereits seit langer Zeit beschäftigt. Wesentliche Fortschritte in der Erkenntnis dieser physiologischen Vorgänge sind auch hier durch das Studium des verschiedenen Verhaltens der Stereoisomeren dieser Verbindungen in den Organismen erzielt worden.

Schon früh wurde festgestellt, dass ähnlich wie die Kohlehydrate, auch die beiden Komponenten racemischer Aminosäuren, wenn man sie dem Pflanzen- oder Tier-

---

[1]) C. Neuberg und J. Wohlgemuth, Ztschr. f. physiol. Chem, **35**,41 (1902); C. Neuberg und P. Mayer, Ztschr. f. physiol. Chem. 37,530 (1903).

körper als Stickstoffnahrung darbietet, sehr verschieden assimiliert werden. So beobachtete Engel[1]), dass durch Pilzvegetation die Lösung racemischer Asparaginsäure linksdrehend wird und in ähnlicher Weise konnten Menozzi und Appiani[2]) eine Aktivierung von racemischer Glutaminsäure feststellen. Da indes bei der Mehrzahl der älteren Arbeiten eine Isolierung der aktivierten Aminosäuren nicht durchgeführt wurde und häufig auch keine Angaben über das Pilzmaterial und über die quantitative optische Untersuchung des Produktes vorliegen, so ist nicht immer klar ersichtlich, ob die beobachtete Drehung der Lösungen nicht etwa auf andere in Lösung gegangene Stoffwechselprodukte der Pilze zurückzuführen ist.

Späterhin hat man dann vielfach durch Mikroorganismen aktivierte Aminosäuren isolieren können, aber nur in seltenen Fällen optisch reine Produkte erhalten. So beobachteten E. Fischer[3]) und später Mac Kenzie und Harden[4]), dass Penicillium glaucum und Aspergillus niger in den Lösungen von racemischem Alanin wachsen und dabei das d-Alanin teilweise zum Verschwinden bringen. Eine Methode zur Reindarstellung des l-Alanins hat sich aber auf diese Beobachtung nicht gründen lassen. Ungefähr 60% Racemkörper enthaltendes d-Cystin gewannen C. Neuberg und P. Mayer[5]) bei der Einwirkung von Aspergillus niger auf r-Cystin. Auch konnte Wohlgemuth[6]) durch Tierversuche zeigen, dass auch der höhere Organismus ihm dargebotene racemische Aminosäuren, ähnlich wie sich bei den Kohlehydraten herausgestellt hatte, nur die eine natürlich vorkommende Komponente voll ausnutzt und verbrennt, während die andere den Verdauungsapparat fast unangegriffen passiert.

---

[1]) Compt. rend. **106**,1734 (1888); Centr. Blatt **2**,1027 (1888).
[2]) Atti R. Ac. dei Lincei, 5. Ser. **1**,38 (1892.)
[3]) Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **32**,2459 (1899).
[4]) Proc. Chem. Soc. **19**,48 (1903).
[5]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **44**.508 (1905).
[6]) Ber. **38**,2064 (1905).

Die totale Spaltung einer racemischen Aminosäure und die Reingewinnung einer optisch aktiven Verbindung daraus gelang indes nach den früher angewandten biologischen Methoden allein E. Schulze und seinen Mitarbeitern und zwar auch nur in je einem Falle bei dem Leucin, der α-Amino-n-Capronsäure und der Glutaminsäure, aus deren Lösungen durch Aussaat von Penicillium glaucum der Antipode der natürlich vorkommenden aktiven Verbindung mit dem vollen Drehungswert erhalten werden konnte[1]).

Aber gerade die Schwierigkeiten, unter denen diese Spaltungen verliefen, die umständliche Bereitung einer Nährlösung, das Erfordernis peinlich durchgeführter Sterilisierung, die Tatsache, dass diese Versuche wochen- und oft monatelang dauerten, und auch dann häufig nur zu unvollkommener Spaltung führten, machte es erklärlich, dass die Spaltung racemischer Aminosäuren mittels des biologischen Verfahrens für die praeparative Darstellung der optisch aktiven Verbindungen bisher kaum in Betracht kam. Dem hier lange Zeit hindurch bestehenden Mangel haben die von E. Fischer[2]) geschaffenen Methoden abgeholfen, die auf der Zerlegung der racemischen Aminosäuren durch Kombination ihrer Benzoyl- und Formylderivate mit Alkaloiden und fraktionierter Krystallisation der erhaltenen Salzpaare beruhen. Mit ihrer Hilfe war es erst möglich in grösserem Masstabe die natürlich vorkommenden Aminosäuren künstlich zu bereiten, die dann weiterhin in Fischers Händen das Ausgangsmaterial zu den berühmten Synthesen der Polypeptide bildeten.

---

[1]) Schulze und Bosshard, Ber. **18**,388 (1885); Ztschr. f physiol Chem. **10**,134 (1886); Schulze und Likiernik, Ber. **24**,671 (1891); E. Schulze, Ber. **26**,56 (1893); Schulze und Likiernig, Ztschr. f physiol. Chem. **17**,523 (1893).

[2]) Ber. **32**,2451 (1900); **33**,2370 (1900); **33**,2833 (1900); Fischer und Hagenbach, Ber. **34**,3764 (1901); E. Fischer und Warburg, Ber. **38**,3997 (1905).

Neben der von Fischer geschaffenen Darstellungsweise optisch aktiver Aminosäuren hat sich die biologische Spaltungsmethode erst wieder in die Praxis der Eiweisschemie eingeführt durch das jüngst von F. Ehrlich auf völlig neuer Grundlage aufgebaute Verfahren zur Vergärung von Aminosäuren mittels Hefe[1]).

Das Prinzip dieses Verfahrens weicht in wesentlichen Punkten von den bisher bekannten ab. Die älteren biologischen Methoden beruhen, wie schon erwähnt, nämlich immer darauf, dass man Spuren der Reinkultur eines Pilzes in eine mit Nährsalz versetzte Lösung der betreffenden racemischen Aminosäure einimpfte und das darauf wachsende Mycel solange wuchern liess, bis die erwartete Spaltung eingetreten war.

Demgegenüber verläuft das von F. Ehrlich ausgearbeitete Spaltungsverfahren bedeutend schneller und einfacher und liefert auch reinere Produkte und bessere Ausbeuten. Diese Methode besteht im wesentlichen darin, dass man die betreffende racemische Aminosäure in einer Zuckerlösung mit einem grossen Ueberschuss bereits fertig gebildeter stickstoffarmer Hefe vergären lässt. Während die Hefe den Zucker zu Alkohol und Kohlensäure vergärt, sättigt sie sich hierbei gleichzeitig mit dem Stickstoff vorwiegend der einen Komponente der Aminosäure, die sie hauptsächlich zufolge der allgemeinen Gleichung:

$$R \cdot CHNH_2 \cdot COOH + H_2O = R \cdot CH_2OH + CO_2 + NH_3$$

abbaut und lässt nach vollständiger Vergärung des Zuckers den grössten Teil der anderen Komponente unangegriffen in der Lösung zurück. Als das geeigneteste Gärmaterial hat sich für diese Zwecke die im Handel leicht und billig in grossen Mengen zugängliche obergärige Getreide-Presshefe erwiesen, die in Spiritusbrennereien und Bäckereien im grossen Masstabe An-

---

[1]) Biochem. Ztschr. 1,8 (1906); F. Ehrlich und A. Wendel, Biochem. Ztschr. 8,438 (1908); F. Ehrlich im Handbuch der Biochemischen Arbeitsmethoden von Abderhalden, 2,559 (1910)

wendung findet. Die mit Hilfe eines solchen Hefematerials nach F. Ehrlich durchgeführte Spaltungsmethode bietet gegenüber allen anderen bisher bekannten biologischen Verfahren den grossen Vorteil, dass sie jede Bereitung einer Nährlösung überflüssig macht, in sehr kurzer Zeit, nämlich gewöhnlich schon in 2—3 Tagen vollständig verläuft und bei richtiger Abmessung der Mengenverhältnisse von Hefe, Zucker und Aminosäure zur totalen Spaltung der letzteren und zur Gewinnung ihres natürlichen Antipoden führt, dessen Isolierung man in sehr einfacher Weise durch Abfiltrieren der vergorenen Flüssigkeit von der Hefe, Eindampfen und direkte Krystallisation meist in einer Reinausbeute von 60—80% der theoretischen leicht bewerkstelligen kann.

Auf diesem bequemen Wege gelang es F. Ehrlich, eine ganze Reihe teils schon bekannter, teils bis dahin noch unbekannter optisch aktiver Aminosäuren aus den entsprechenden Racemverbindungen in optisch reiner Form darzustellen und damit eine leicht zu handhabende praeparative Methode zu schaffen, die in der physiologischen Chemie vielfacher Anwendung fähig ist. So wurden bisher rein gewonnen das d-Leucin, l-Alanin, l-Valin[1]), das d-Phenylalanin und d-Serin[2]), und ferner zum ersten Mal in optisch aktiver Form die α-Aminophenylessigsäure (Phenylglykocoll) und die α-Aminomethyläthylessigsäure (Isovalin)[2]). Ausser diesen Spaltungen konnte F. Ehrlich durch Zerlegung des Gemisches von d-Isoleucin und d-Alloisoleucin[3]) d. h. zweier stereoisomerer Aminosäuren, die durch gegenseitige Umlagerung entstehen, aber nicht Spiegelbilder voneinander sind, die grosse praktische Nutzanwendung dieser Methode erweisen, die namentlich für die Auffindung der alkoholischen Gärung der Aminosäuren[4]) grosse analytische Bedeutung gewonnen hat.

---

[1]) F. Ehrlich, Biochem. Ztschr. **1**,8 (1906).

[2]) F. Ehrlich und A. Wendel, Biochem. Ztschr. 8,438 (1908).

[3]) F. Ehrlich, Ber. **40**,2538 (1907).

[4]) F. Ehrlich, Ueber die Enstehung des Fuselöls, Ztschr. d. Vereins d. Deutsch. Zuckerind. **55**,539 (1905). — Die chemischen

Allerdings teilt auch die Vergärung der racemischen Aminosäuren mittels Hefe und Zucker mit allen anderen biologischen Spaltungsverfahren den Übelstand, dass man mit ihrer Hilfe nur die der natürlichen entgegengesetzte Raumform der betreffenden Aminosäure gewinnt, während dabei gerade die für Physiologen interessanteste, nämlich die natürlich vorkommende Verbindung der Zerstörung durch die Hefe anheimfällt. Indessen gewinnt die leicht und schnell auszuführende Arbeitsmethode F. Ehrlichs neuerdings eine besondere Bedeutung, nachdem E. Fischer bei seinen Synthesen der Polypeptide gezeigt hat, dass man auch, vom Antipoden einer natürlichen Aminosäure ausgehend, mit Hilfe der Waldenschen Umkehrung [1]) zu Derivaten und Verbindungen gelangen kann, die der natürlich vorkommenden Aminosäure entsprechen, und dass in einzelnen solcher Fälle z. B. bei der Bereitung des l-Alanins für die Darstellung des d-Alanyl-d-Alanins die Vergärung des Racemkörpers den chemischen Spaltungsmethoden gegenüber zu bevorzugen ist [2]).

Was die Ausbeute an reiner optisch aktiver Substanz nach dem Gärverfahren anbetrifft, so kann diese im besten Falle nur $^2/_3$—$^4/_5$ der theoretischen betragen. Die Ursache dafür ist einmal darin zu suchen, dass der Stickstoffgehalt der Hefe ein sehr schwankender ist, und dass je nach dem Ueberschuss von Hefe und Zucker ver-

---

Vorgänge bei der Hefegärung, Biochem. Ztschr. 2,52 (1906). — Zur Frage der Fuselölbildung der Hefe, Ber. 39,4072 (1906). — Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweissaufbau der Hefe. Ber. 40,1027 (1907). — Über die chemischen Vorgänge des pflanzlichen Eiweissstoffwechsels. Landwirtschaftliche Jahrbücher. Ergänzungsband 5,289 (1909). —

[1]) E. Fischer, Zur Kenntnis der Waldenschen Umkehrung, Ber. 40,489 (1907).

[2]) E. Fischer und A Schulze. Derivate des d-Alanins, Ber. 40,943 (1907).

schiedene Mengen der Aminosäure verarbeitet werden, andererseits zeigt sich aber, dass auch bei Anwendung von Hefe- und Zuckermengen, die gerade ausreichen, um eine totale Vergärung der einen Komponente der racemischen Aminosäure zu bewirken, stets auch ein Teil des optischen Antipoden mitangegriffen wird, da selbst bei sorgfältigster Aufarbeitung der vergorenen Lösungen regelmässig weniger als die berechnete Menge zurückgewonnen wird.

Fast immer hat sich in den bisherigen Fällen bei richtiger Wahl der Mengenverhältnisse von Aminosäure, Hefe und Zucker nach vollständiger Vergärung des letzteren das eine Stereoisomere der betreffenden Aminosäure chemisch und optisch rein isolieren lassen. Ausnahmen in dieser Hinsicht bilden eigentlich nur die Beispiele der α-Amino-phenylessigsäure, der α-Amino-methylaethylessigsäure und der β-Amino-buttersäure, bei deren Vergärung sich bisher nicht mit Sicherheit angeben liess, ob geringe Differenz in der Angriffsgeschwindigkeit der beiden Komponenten durch die Hefe oder nicht vielmehr leichte Razemisierbarkeit Ursache der Inaktivität, resp. des stark schwankenden Drehungsvermögens der verschiedenen vergorenen Präparate gewesen ist.

Angesichts des grossen Interesses, das die Reingewinnung optisch aktiver Aminosäuren für die Chemie der Proteine und die künstliche Bereitung der Polypeptide besitzt, habe ich auf Anregung von Prof. Dr. F Ehrlich in der folgenden Arbeit versucht die Methode der Vergärung mittels Hefe und Zucker auf verschiedene andere wichtige racemische Aminosäuren anzuwenden. Die Untersuchungen erstreckten sich einmal darauf, ob die Methode zur praeparativen Bereitung des optischen Antipoden weiterer bekannter Eiweissspaltungsprodukte, Aminosäuren und Polypeptiden, ebenfalls geeignet ist. Fernerhin wurden

Beobachtungen darüber angestellt, in welchem Masse die Komponenten der Racemverbindungen von der Hefe ausgenutzt werden. Endlich versuchte ich noch festzustellen, welche Abbausubstanzen in einzelnen Fällen bei der Hefeeinwirkung entstehen.

Untersucht wurden in dieser Richtung die Asparaginsäure, die Glutaminsäure, das Tyrosin, Prolin, Histidin sowie das Alanyl-Glycin. Die Resultate der Untersuchungen lassen sich in zwei Gruppen sondern.

Die völlige Spaltung und die Reingewinnung des optischen Antipoden der natürlich vorkommenden Verbindung gelang bei dem Racemkörper der Glutaminsäure und des Histidins.

Die l-Glutaminsäure wurde zu 70% der theoretischen Ausbeute optisch rein gewonnen. Sie besass in salzsaurer Lösung [1 mol, HCl] das spezif. Drehungsvermögen $[\alpha]_D^{20^0} = -30{,}02^0$, während E. Fischer[1]) bei dem chemischen Spaltungsverfahren unter denselben Bedingungen: $[\alpha]_D^{20^0} = -30{,}05^0$ beobachtete.

In gleicher Reinheit liess sich durch Vergärung des racemischen Histidins der Antipode der natürlich vorkommenden Raumform, das d-Histidin darstellen, das auf diese Weise zum ersten Mal bekannt geworden ist. Seine Isolierung wurde nicht wie üblich durch Eindampfen der vergorenen Lösung, sondern durch Fällung seines schwer löslichen Quecksilbersalzes durchgeführt. Das so zunächst isolierte salzsaure Histidin zeigte in Form des Dichlorids die spezif. Drehung: $[\alpha]_D^{20} = -7{,}31^0$, die daraus mit Bleioxyd freigemachte Base: $[\alpha]_D^{20} = +37{,}88^0$. Diese Zahlen weichen nur sehr wenig ab von den Angaben von A. Kossel und F. Kutscher[2]), die

[1]) E. Fischer, Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine (1899–1906) S. 105.

[2]) A. Kossel u. Fr. Kutscher. Ztschr. d. physiolog. Chemie 28,382 (1899).

für das natürliche Histidin $[\alpha]_D^{20^0} = -39{,}74^0$ und für das Dichlorid unter ähnlichen Bedingungen $[\alpha]_D^{20} = +6{,}46^0$ fanden. Die Ausbeute an optisch aktivem Körper war bei der Vergärung des Histidins anfangs weniger gut, da derselbe meistens durch Gärprodukte des Histidins verunreinigt war, deren Abtrennung erst späterhin gelang. Immerhin liess sich nach dieser Methode in einem Falle eine Ausbeute des d-Histidins bis zu 60% der theoretischen erzielen.

Es gelang ferner zum ersten Mal durch Vergärung mit Hefe und Zucker ein racemisches Polypeptid zu spalten, nämlich das Alanyl-Glycin. Die vergorene Substanz zeigte nach mehrfacher Krystallisation in wässriger Lösung eine spezif. Drehung von $[\alpha]_D^{20^0} = -23^0$, schien also aus einem Gemisch von l- und dl-Alanyl-Glycin zu bestehen, da E. Fischer[1]) für die entsprechende optisch reine Komponente die Drehung $[\alpha]_D^{20} = -48{,}6^0$ angibt. Eine vollständige Reinigung des äusserst leicht löslichen optisch aktiven Körpers liess sich indes trotz vielfacher Versuche nicht erzielen, da auch bei häufig wiederholtem Umlösen der Substanz aus Wasser und Fällung durch Alkohol immer wieder anorganische aus der Hefe herstammende Substanzen mitniedergerissen wurden. Immerhin zeigte die Durchführung des Spaltungsversuches deutlich, dass ähnlich wie die von E. Fischer und Abderhalden untersuchten, auch die in der Hefe tätigen Enzyme, Polypeptide asymmetrisch abbauen, wenn auch speziell in dem Fall des Alanyl-Glycins die Unterschiede in der Angriffsgeschwindigkeit der beiden Komponenten scheinbar nicht so gross sind, dass sie zur Reingewinnung der optisch aktiven Verbindung dienen können.

Von allen bisherigen gänzlich abweichende Resultate wurden nun erhalten, als man versuchte, die Racemver-

[1]) Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine (1899—1906) S. 497.

bindungen der Asparaginsäure, des Tyrosins und des Prolins durch Hefegärung zu spalten. In allen Fällen zeigte sich deutlich, dass wenn man diese racemischen Aminosäuren unter den früher für die anderen Aminosäuren angegebenen günstigsten Bedingungen mit überschüssiger Hefe und Zucker vergärt, regelmässig ein mehr oder minder grosser Teil der Substanz aus den Lösungen verschwindet, also von der Hefe angegriffen sein muss. Immer ergab aber eine genaue Untersuchung der aus den vergorenen Lösungen zurückgewonnenen Präparate ihre vollständige optische Inaktivität, auch wenn bei Aufarbeitung der Flüssigkeiten die peinlichsten Vorsichtsmassregeln befolgt waren. In einzelnen Fällen, wie z. B. bei der Asparaginsäure, liess sich sogar zeigen, dass bei Anwendung eines starken Ueberschusses von Hefe und Zucker die racemische Aminosäure vollständig aus der Lösung zum Verschwinden zu bringen ist, was bisher noch niemals beobachtet worden war. Da die Versuchsbedingungen eine Wiederracemisierung etwa zuerst entstandener optisch aktiver Verbindungen ausschliessen, so unterliegt es keinem Zweifel, dass die Hefe die Racemkörper der Asparaginsäure, des Tyrosins und des Prolins abweichend von allen anderen bisher untersuchten α-Aminosäuren symmetrisch angreift, d. h. die Rechts- und die Linkskomponente mit gleicher Geschwindigkeit abbaut und verarbeitet.

Derartige Ausnahmefälle von der allgemein bestätigt gefundenen Regel, dass die Enzyme asymmetrisch auf das Substrat einwirken, sind sehr bemerkenswert und bisher nur ganz vereinzelt bekannt geworden. Hierzu gehört die von Buchner und Meisenheimer[1]) beobachtete Bildung von racemischer Milchsäure bei der Vergärung des Zuckers mit Milchsäurebakterien. Ferner wäre hier noch zu erwähnen der gleichartige Angriff der verschiedenen Raumformen des Tyrosins durch die

[1]) Liebig's Annalen **349**,125 (1906).

Tyrosinase aus Russula Queletii, die G. Bertrand und M. Rosenblatt[1]) feststellen konnten, und die ähnliche Wirkungsweise der peptolytischen Fermente verschiedener Pilze, wie sie von E. Abderhalden und H. Pringsheim[2]) beobachtet wurde. Führen wir hier noch das von C. Neuberg[3]) studierte Verhalten von racemischer Glutaminsäure bei der Fäulnis an, wobei immer inaktive Produkte zurückgewonnen wurden, so dürfte damit die Aufzählung der Beispiele erschöpft sein, bei denen es sich wirklich um symmetrisch verlaufende enzymatische Prozesse gehandelt hat.

Dem gegenüber sind nun aber die bei der Hefegärung racemischer Aminosäuren gemachten Befunde von ganz besonderer Bedeutung, da hier zum ersten Mal an ein und demselben Organismus eine ganze Reihe von systematischen Beobachtungen vorliegen, die sehr wesentliche Unterschiede der Wirkungsweise des Organismus auf die Racemverbindungen der einzelnen natürlich vorkommenden Eiweissspaltungsprodukte erkennen lassen. Sehr beachtenswert in dieser Hinsicht ist namentlich, dass der Hefepilz ganz ähnlich konstituierte racemische Aminosäuren bei der Assimilation sehr verschieden angreift. So wird z. B. der Racemkörper der Glutaminsäure von der Formel $CO_2H \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CHNH_2 \cdot CO_2H$ analog dem des Alanins, Leucins et cet in normaler Weise asymmetrisch abgebaut, wobei vorzugsweise die natürlich vorkommende d-Glutaminsäure zerstört wird, während hingegen von der in der Natur nicht minder verbreiteten Asparaginsäure von der Formel $CO_2H \cdot CH_2 \cdot CHNH_2 \cdot CO_2H$, die sich von der ersten nur durch einen Mindergehalt einer CH_2-Gruppe unterscheidet, beide Raumformen vollkommen gleichmässig von der Hefe assimiliert werden,

[1]) Compt. rend. de l'Acad. des sciences **146**,304 (1908).
[2]) Ztschr. f. physiol. Chem. **59**.247 (1909).
[3]) Biochem. Ztschr **18**,431 (1909).

so dass jedes Mal ein inaktives Produkt hinterbleibt oder die Aminosäure gänzlich aus der Lösung verschwindet.

Sucht man eine Erklärung für die eigentümliche Erscheinung zu geben, so erscheint die Annahme am meisten nah zu liegen, dass die Hefe aus dem Grunde keinen Unterschied bei der Verarbeitung der beiden Stereoisomeren der Asparaginsäure, des Tyrosins und des Prolins macht, weil in natürlichen Produkten sowohl die d-, wie die l-Form dieser Aminosäuren vorkommen, und deshalb die Enzyme des Organismus auf beide gleichmässig eingestellt sind und sie als natürliche Stickstoffnahrung verwerten.

In der Tat kann man aus einer ganzen Reihe von Litteraturstellen Anhaltspunkte dafür gewinnen, dass die genannten 3 Aminosäuren im Gegensatz zu vielen anderen in pflanzlichen und tierischen Stoffen sich in beiden optischen Modifikationen vorfinden, wenn auch bestimmte Angaben über ein derartiges Vorkommen bisher nicht gemacht sind. So erklären bereits Schulze und Winterstein[1]) das relativ niedrige Drehungsvermögen des aus verschiedenen Keimpflanzen erhaltenen Tyrosins mit der Annahme, dass demselben entweder racemisches oder rechtsdrehendes Tyrosin in geringer Menge beigemischt ist. Während nämlich E. Fischer[2]) für das chemisch gespaltene optisch reine Tyrosin in 4% Salzsäurelösung spezif. Drehung $[\alpha]_D^{20} = -16{,}4^0$ fand, beobachteten die genannten Forscher[3]) bei Präparaten aus Dhaliaknollen Drehungen unter denselben Bedingungen von $-12{,}5^0$ bis $-12{,}9^0$ und auch aus anderen Keimpflanzen z. B. von Cucurbita Pepo und Kartoffelknollen[4]) liess sich nicht höher als $-14{,}6^0$ bis $-16{,}1^0$ drehendes Tyrosin iso-

[1]) Ztschr. f. physiol. Chem. **45**,79 (1905).
[2]) Ber. **32**,3638 (1900).
[3]) Ztschr. f. physiol. Cem. **45**,79 (1905)
[4]) Ztschr. f. physiol. Chem. **45**,79 (1905).

lieren. In allen diesen Fällen handelt es sich um chemisch reines Tyrosin, das durch Autolyse gewonnen und bei dessen Darstellung eine Wiederracemisierung des Produktes ausgeschlossen war. In Beziehung zu diesen Befunden steht auch die Tatsache, dass E. Fischer[1]) und die oben genannten Forscher[2]) bei der Hydrolyse von verschiedenen Eiweissarten ähnlich niedrig drehende Präparate von der Bruttozusammensetzung des Tyrosins erhielten, z. B. bei der Spaltung des Caseins mit Salzsäure ($[\alpha]_D^{20} = -12{,}56^0$) und ferner auch bei anderen Eiweissarten ($[\alpha]_D^{20} = -11{,}6^0$).

Dass ausser der weit verbreiteten l-Asparaginsäure auch die d-Asparaginsäure in natürlichen Produkten vorkommt, darauf deutet bereits der schon erwähnte Befund Piuttis hin, dass dem natürlichen l-Asparagin häufig d-Asparagin beigemengt ist, aus denen bekanntlich durch Abspaltung von Ammoniak leicht Asparaginsäure entsteht. Aber auch bei den von Fischer durchgeführten Hydrolysen einer Reihe von Eiweisskörpern hat sich stets gezeigt, dass von der Asparaginsäure immer nur Gemische der aktiven mit der Racemverbindung zu erhalten waren, und dass auch das aktive Prolin dabei nie direkt optisch rein gewonnen werden konnte, sondern immer erst von einem beträchtlichen Teil gleichzeitig abgespaltenen racemischen Prolins getrennt werden musste.

In der folgenden Tabelle sind einige Angaben über die von E. Fischer und seinen Mitarbeitern[3]) bei der Hydrolyse von verschiedenen Eiweissarten mit Säuren erhaltenen Mengenverhältnisse der optisch aktiven und Racemverbindung der Asparaginsäure und des Prolins enthalten:

---

[1]) Ber. **32**,3646 (1900).

[2]) Ztschr. f. physiol. Chem. **45**,79 (1905).

[3]) E. Fischer, Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine (1899—1906) SS. 639—714

Hydrolysierter Eiweisskörper		Prolin erhalten		Asparaginsäure erhalten
Menge in gr.	Name	gr. aktiv.	gr. racem.	
500	Casein [1])	10,50	5,50	Gemisch [6])
250	Eieralbumin [2])	1,15	0,40	
—	Gelatine [3])	Gemisch		Gemisch [7])
1000	Horn [4])	19,5	11,0	Gemisch [8])
—	Oxyhaemoglobin [5])	Gemisch		

Es wäre noch einzuwenden, dass bei der Hydrolyse von Proteinen deswegen immer niedriger drehende Präparate sowohl von Asparaginsäure und Prolin, wie auch von Tyrosin zu isolieren sind, weil vielleicht durch das andauernde Kochen mit Säuren, ähnlich wie bei der Behandlung mit Alkali, eine partielle Razemisierung der ursprünglich aktiven Aminosäuren stattfindet [9]). Wenn diese Annahme zutreffend wäre, müsste man bei längerem Erhitzen mit konzentrierten Mineralsäuren eine weitere

[1]) E. Fischer, Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine (1899—1906) S. 639.

[2]) Ibidem S. 668.

[3]) Ibidem S. 674.

[4]) Ibidem S. 710—711.

[5]) Ibidem S. 701.

[6]) Ibidem S. 649.

[7]) Ibidem S. 676.

[8]) Ibidem S 713—714.

[9]) Ibidem S. 63: „Alle kohlenstoffreicheren Aminosäuren finden sich in den Proteinen in optisch aktiver Form, sie werden aber bei der Hydrolyse durch Säuren partiell racemisiert. Infolgedessen hat man es stets mit einem Gemisch von racemischer und aktiver Form zu tun. . . .“

Erniedrigung des Drehungsvermögens der aktiven Präparate und eine schliessliche vollständige Razemisierung erreichen können. Ich habe daher noch Versuche angestellt, bei denen aktive Asparaginsäure und aktives Prolin für sich genau unter den Bedingungen der Eiweisshydrolyse bis zu 24 Stunden mit überschüssiger Mineralsäure am Rückflusskühler gekocht wurden. In keinem einzigen Falle liess sich nach dieser Zeit eine Drehungsverminderung der betreffenden aktiven Aminosäure feststellen.

Damit erscheint der Beweis geliefert, dass bei der Säurehydrolyse von Eiweiss keine Razemisierung der optisch aktiven Spaltungsprodukte eintritt, dass vielmehr tatsächlich beide Raumformen der Asparaginsäure, des Prolins und des Tyrosins im Eiweiss und anderen natürlichen Produkten ursprünglich vorkommen. Mit diesem natürlichen Vorkommen findet dann auch die eigentümliche Erscheinung eine genügende Erklärung, dass die Racemformen dieser 3 Aminosäuren abweichend von den der anderen Eiweissspaltungsprodukte bei der Assimilation durch die Hefe symmetrisch und nicht asymmetrisch abgebaut werden. Für die Kenntnis des Chemismus der enzymatischen Prozesse in der Natur wird es von Wert sein weiter zu erforschen, ob auch andere Aminosäuren und ob ausser der Hefe noch andere Organismen ein ähnliches Verhalten zeigen.

Es schien schliesslich noch interessant näher zu untersuchen, welche chemischen Abbauprodukte die oben erwähnten racemischen Aminosäuren bei ihrer Vergärung mit Hefe bilden. Wie F. Ehrlich[1]) gezeigt hat, wird

---

[1]) Über die Entstehung des Fuselöls. Zeitschr. d. Vereins d Deutschen Zuckerind. **55**,539 (1905). – Die chemischen Vorgänge bei der Hefegärung Biochem. Ztschr **2**,52 (1906). — Zur Frage der Fuselölbildung der Hefe. Berichte d. Deutsch. chem. Gesellsch. **39**,4072 (1906). — Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweissaufbau der Hefe. Ber. d Deutsch chem. Gesellsch. **40**,1027 (1907). — Über die chemischen Vorgänge des pflanzlichen Eiweissstoff-

bei der Assimilation nicht das ganze Molekül der Aminosäure von der Hefe aufgenommen, sondern nur Ammoniak abgespalten, das die Hefe zusammen mit Bruchstücken des Zuckers zu Eiweiss aufbaut, während der stickstofffreie Rest des Aminosäuremoleküls als unverwertbar aus dem Stoffwechselprozess ausscheidet. Auf diese Weise entsteht aus dem Leucin Amylalkohol, aus der Glutaminsäure die Bernsteinsäure und aus den übrigen Aminosäuren eine Reihe von anderen Gärungsnebenprodukten, die man früher irrtümlich als Spaltungssubstanzen des Zuckers auffasste, die namentlich für den Geschmack und das Aroma der gegorenen Getränke von grosser Bedeutung sind.

Auch bei der Vergärung von racemischer Glutaminsäure konnte ich, ähnlich wie von F. Ehrlich[1]) angegeben ist, eine der verschwundenen Menge Glutaminsäure ungefähr entsprechende Quantität Bernsteinsäure isolieren. Ebenso wurde bei der Vergärung des racemischen Tyrosins das nach der Gleichung

$$OH \cdot C_6H_4 \cdot CH_2CH(NH_2)CO_2H + H_2O =$$
$$= OH \cdot C_6H_4 \cdot CH_2 \cdot CH_2OH + CO_2 + NH_3$$

zu erwartende Abbauprodukt, der p-Oxyphenyläthylalkohol[2]), in guter Ausbeute gewonnen und mit dem bereits von F. Ehrlich dargestellten Präparat aus l-Tyrosin identisch gefunden.

Von besonderem Interesse dürfte die hier zum ersten Mal gelungene Isolierung des Vergärungsproduktes des

---

wechsels. „Landwirtschaftliche Jahrbücher." Ergänzungsb. **5**,289 (1909). – Über die Entstehung der Bernsteinsäure bei der alkoholischen Gärung. Biochem. Ztschr. **18**,391 (1909). —

[1]) Über die Entstehung der Bernsteinsäure bei der alkoholischen Gärung. Biochem. Ztschr. **18**,391 (1909). —

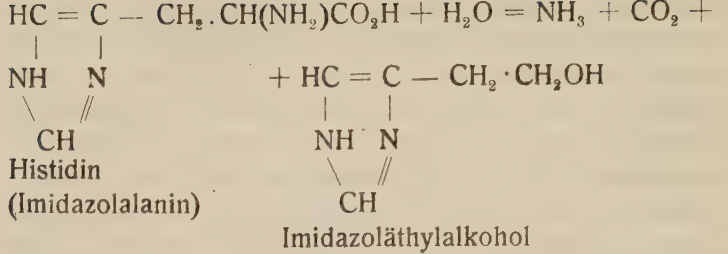
[2]) Über die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweissaufbau der Hefe. Ber. **40**,1027 (1907). — Über die chemischen Vorgänge des pflanzlichen Eiweissstoffwechels. Landwirtschaftl. Jahrbücher. Ergänzungsband **5**.306 (1909). — Ueber die Vergärung des Tyrosins zu p-Oxyphenylaethylalkohol (Tyrosol). Ber. d. Deutsch. Chem. Ges. **44**, 139 (1911).

Histidins durch die Hefe sein. Man kann diese Substanz in vollständig vergorenen Histidinlösungen durch ihre dieser Aminosäure sehr ähnlichen Reaktionen, aber sonst gänzlich von derselben abweichenden physikalischen Eigenschaften leicht nachweisen, indes bietet ihre Reindarstellung infolge der äusserst grossen Löslichkeit der Substanz und ihrer Verbindungen und infolge der geringen Neigung derselben zu krystallisieren oder schwer lösliche Derivate zu geben, bisher unüberwindliche Schwierigkeiten. Die Substanz lässt sich ebenso, wie das Histidin, mit Quecksilberchlorid fällen und gibt wie dieses eine Rotfärbung mit Diazobenzolsulfosäure[1]), aber nicht die Knoopsche Bromreaktion[2]). Zum Unterschied vom Histidin ist die Verbindung, ebenso wie ihr Chlorhydrat, in Wasser und Alkohol spielend leicht löslich und äusserst hygroskopisch. Auch das aus der absolut alkoholischen Lösung mit Aether gefällte und im Vakuum getrocknete Chlorhydrat zerfliesst sofort an der Luft unter Dunkelfärbung, so dass sich eine Elementaranalyse damit nicht ausführen liess. Die einzige schwer lösliche Verbindung, die sich ausser dem Quecksilbersalz darstellen liess, war ein Platinat, das sofort ausfällt, wenn man die Lösung des Chlorhydrats ohne weiteres Ansäuern mit Platinchloridlösung versetzt. Dabei fällt ein rotgelber Niederschlag aus, der die Zusammensetzung eines Semiplatinats des zu erwartenden Imidazoläthylalkohols besitzt. Da auch andere Imidazolderivate und Stickstoffkohlenstoffringe derartige anormale Semisalze des Platins bilden, so erscheint hieraus ebenso wie aus den übrigen Reaktionen die Herleitung der Annahme berechtigt, dass die Vergärung des Histidins durch die Hefe analog den übrigen Aminosäuren nach der Gleichung

---

[1]) H. Pauly, Centr. Blatt **2**,1289 (1904).

[2]) Franz Knoop, Eine Farbenreaktion d. Histidins. Hofmeisters Beiträge, **11**,7—9 (1908). —



verläuft. Zu bemerken wäre noch, dass die wässrige Lösung des gereinigten Alkohols selbst intensiv süss schmeckt. Vielleicht bildet der Imidazoläthylalkohol zusammen mit anderen Abbauprodukten von Aminosäuren einen integrierenden geschmacksbildenden Bestandteil des Bieres, in dem sein Vorkommen sehr wahrscheinlich ist.

Experimenteller Teil.

Vergärung der racemischen Glutaminsäure und die Gewinnung der l-Glutaminsäure.

Die aus Melasseabfalllaugen nach dem Verfahren von K. Andrlik[1]) erhaltenen 50 g d-Glutaminsäure wurden nach der Vorschrift von E. Fischer[2]) durch 9-stündiges Erhitzen der wässerigen Lösung mit einem Ueberschuss von Baryt im Autoklaven auf 162°—173° racemisiert. Die dabei erhaltene Lösung war vollkommen farblos. Nach Ausfällung des Baryts und Verdampfung der Lösung im Vakuum liessen sich daraus 36 g. eines ebenfalls fast farblosen Produktes gewinnen, das beim Umkrystallisieren aus Wasser und Behandeln mit Tierkohle 34 g. vollkommen reiner aschenfreier r-Glutaminsäure[3]) vom Schmelzpunkt 199° in offener Capillare ergab.

[1]) Ztschr. d. Vereins d. Deutsch. Zuckerind. **53**,829 (1903.)

[2]) E. Fischer, Walter Kropp u. A. Stahlschmidt: Liebigs Annalen, **365**,183 (1909).

[3]) In der Fischerschen Arbeit ist die Ausbeute nur auf 25g. r-Glutaminsäure aus 50g. der aktiven Verbindung angegeben.

Dass das Präparat inaktiv war, zeigte folgende optische Untersuchung. 0,70 g. bei 110° getrockneter Substanz wurden in $^1/_1$ n-HCl (ca. 2 mol.) gelöst und im 20 mm.-Rohr polarisiert. Bei 20° betrug die Drehung + 0°.

10,0 g. dl-Glutaminsäure wurden in einer grossen Flasche zusammen mit 400 g. Zucker in 4 L. Leitungswasser gelöst und mit 200 g. frischer obergäriger Presshefe Rasse XII[1]) solange vergoren, bis sich in der klar filtrierten Flüssigkeit mit α-Naphthol kein Zucker mehr nachweisen liess. Die Gärung verlief bei Zimmertemperatur innerhalb 3 Tagen vollständig. Die Hefe wurde darauf durch einen Tonkolben abgesaugt, mit Wasser gründlich nachgewaschen und das Filtrat zusammen mit den Waschwässern im Vakuum bei 35—45° bis auf ein kleines Volumen eingedampft, das nach Behandlung mit Tierkohle weiter auf ungefähr 150 ccm konzentriert wurde. Bei starkem Abkühlen schieden sich daraus über Nacht farblose Krystalle ab, deren Menge nach dem Abfiltrieren und Trocknen 1,2 g. betrug. Sie bestanden aus fast reiner l-Glutaminsäure.

Bei weiterem Einengen der Mutterlaugen wurden noch 3,5 g. farbloser Substanz gewonnen, die indes nicht einheitlich war. Durch Extraktion mit Äther liess sich nämlich daraus 1,2 g. Bernsteinsäure isolieren, die offenbar bei der Hefegärung aus der Glutaminsäure entstanden war, wie F. Ehrlich früher nachgewiesen hat[2]).

Nach der Entfernung der Bernsteinsäure gelang es noch 2,3 g. fast reiner aktivierter Glutaminsäure zu er-

---

[1]) Die zu diesen und den folgenden Versuchen benutzte obergärige Presshefe Rasse XII, welche die Mutterhefe fast sämtlicher deutscher Presshefefabriken und Brennereien bildet, wurde regelmässig aus dem Institut für Gärungsgewerbe, Berlin N. Seestrasse, bezogen.

[2]) F. Ehrlich, Ueber die Entstehung der Bernsteinsäure bei der alkoholischen Gärung. Biochem. Ztschr. 18,391 (1909.) —

halten, so dass die Gesamtausbeute an l-Glutaminsäure 3,5 g. betrug.

Die Substanz wurde zur vollständigen Reinigung aus wenig heissem Wasser umgelöst, wobei ca. 2,8 g. der typischen Kristalle aktiver Glutaminsäure resultierten, die nach dem Trocknen bei 110° für die folgenden Bestimmungen verwandt wurden.

Die durch Gärung erhaltene l-Glutaminsäure schmolz bei raschem Erhitzen bei 208° unter Zersetzung, wie dies auch E. Fischer[1]) für die chemisch gespaltene aktive Aminosäure angibt. —

0,1080 g. Sbst.: 0,1610 gr. CO_2, 0,0610 gr. H_2O

0,1034 g. Sbst.: 8,60 ccm. N (22°, 759 mm.)

Für Glutaminsäure: Ber. C 40,81, H 6,12, N 9,52.

$C_5H_9NO_4$ (mol 147): Gef. C 40,65, H 6,27, N 9,61.

Spezif. Drehung in Salzsäurelösung: 0,2863 g. Sbst. in 1 mol Salzsäure enthaltendem Wasser gelöst. Gesamtgewicht der Lösung 5,4282, Prozentgehalt, 5,27. Spezif. Gewicht 1,0230. Drehung in 100 mm-Rohr: — 1,62° bei Natriumlicht und 20°.

$$\text{Mithin } [\alpha]_D^{20^\circ} = -30{,}02^\circ.$$

E. Fischer gibt für die chemisch gespaltene l-Glutaminsäure unter gleichen Concentrationsbedingungen: $[\alpha]_D^{20^\circ} = -30{,}05$ an, so dass also die durch Gärung gewonnene aktive Aminosäure den vollkommen optisch reinen Antipoden der natürlich vorkommenden Glutaminsäure darstellt.

Um noch die Ausbeute an Bernsteinsäure zu bestimmen, die bei der Vergärung der rac. Glutaminsäure entstanden war, wurden die Mutterlaugen und Filtrate von der erhaltenen l-Glutaminsäure gesammelt, eingedampft und die so erhaltene syrupöse Flüssigkeit nach dem Ansäuern im Zelmanowitz'schen Apparat mit viel

---

[1]) Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine (1899—1906). S. 105.

Äther mehrere Tage extrahiert. Der von Äther befreite Extrakt ergab nach dem Reinigen auf Ton noch 1,5 g. Bernsteinsäure. Zusammen mit der, wie erwähnt, direkt auskristallisierten wurden also im ganzen 2,7 g. Bernsteinsäure erhalten, die den richtigen Schmelzpunkt von 183° C. besass.

Die Vergärung des racemischen Histidins und die Gewinnung von d-Histidin.

Zur Darstellung des Histidins diente die von F. Knoop[1]) modifizierte Methode von Fränkel und Pauly, die in einigen Punkten, wie folgt abgeändert wurde.

9 L. frisches Pferdeblut, das durch Schlagen und Absitzenlassen vom grössten Teil des Serums befreit war, wurde in Porzellanschalen auf dem Dampfbade zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde in grossen Kolben auf dem Baboblech mit 3 Teilen konzentrierter Salzsäure 6 Stunden gekocht, der grösste Teil der Salzsäure sodann im Vakuum abgedampft, der so erhaltene Syrup in wenig warmem Wasser gelöst, mit Natronlauge versetzt, bis nur noch eine schwach saure Reaktion bestand und filtriert. Das weingelb gefärbte Filtrat scheidet häufig nach einigem Stehen einen Niederschlag von Tyrosin aus, von welchem abfiltriert wurde. Die sodann mit Natriumkarbonat deutlich alkalisch gemachte Flüssigkeit wurde nicht länger als 2 Stunden zur Entfernung des Ammoniaks gekocht. Nach dem Abkühlen verdünnte man die Lösung in grossen Flaschen mit viel Wasser und versetzte sie entweder mit einer coucentrierten Kochsalzlösung von Quecksilberchlorid oder mit einer gesättigten alkoholischen Sublimatlösung, wobei man durch Zufügung von Natriumcarbonat dafür Sorge trug, dass eine schwach alkalische Reaktion der Flüssigkeit bestehen blieb. Der in grossen Mengen ausfallende voluminöse

[1]) Beitr. zur chem. Physiol. und Pathol. **10**,115 (1907).

hellgraue Niederschlag wurde nicht durch Absaugen auf der Nutsche, sondern durch mindestens 10 mal wiederholtes gründliches Dekantieren mit sehr viel Wasser ausgewaschen und sodann in wenig Salzsäure gelöst. Die so erhaltene salzsaure Lösung wurde wieder nach Zugabe von Alkali bis zur schwach alkalischen Reaktion mit Sublimat gefällt und der entstandene Niederschlag genau so wie eben beschrieben behandelt. Das durch Dekantieren mit Wasser völlig gereinigte Quecksilbersalz des Histidins wurde schliesslich mit Schwefelwasserstoff zersetzt und das Filtrat von dem gut ausgewaschenen Schwefelquecksilber nach Behandlung mit Kohle bis zur Krystallisation verdampft.

Auf diese Weise wurde aus 9 L. Pferdeblut 140 g. grau gefärbtes Histidinchlorhydrat gewonnen, das sich durch 2 malige Krystallisation aus Wasser gut reinigen liess.

Bestimmung des Chlor- und Wassergehalts des so gewonnenen Präparats ergab, dass Histidin-monochlorid mit einem Molekül Krystallwasser von der Formel $C_6H_9N_3O_2 \cdot HCl \cdot H_2O$ vorlag.

Zur Analyse wurde die Substanz einige Stunden bei gewöhnlicher Temperatur im Vakuum getrocknet:

0,2147 g. Sbst: verloren bei 150° C. 0,0190 g. H_2O
Für $C_6H_9N_3O_2 \cdot HCl \cdot H_2O$: Ber. H_2O 8,60.
(mol 209,5) Gef. „ 8,85.
I. 0,2030 g. Sbstanz: 0,1390 AgCl.
II. 0,2079 g. Substanz: 0,1417 AgCl.
Für $C_6H_9N_3O_2 \cdot HCl \cdot H_2O$: Ber. Cl. 16,92.
(mol 209,5) Gef. „ 16,93 (I).
„ „ 16,85 (II.)

Das so gewonnene Histidinchlorhydrat ist aktiv und dreht, wie in der Literatur[1]) angegeben ist, schwach nach rechts.

---

[1]) Kossel und Kutscher, Ztschr. für physiol. Chem. 28,382 (1899).

Aus dem Chlorhydrat des Histidins wurde die freie Base nicht durch Schütteln mit Silbercarbonat, sondern in der Weise bereitet, dass man die Lösung desselben bis zur Entfernung des Chlors mit gelbem Bleioxyd kochte, abkühlte, filtrierte und zur Fällung des überschüssigen Bleies mit Schwefelwasserstoff behandelte. Die aus dem Filtrat durch Verdampfen gewonnene Base wurde aus verdünnter alkoholischer Lösung nach Klärung mit Tierkohle durch Fällung mit Alkohol krystallisiert erhalten. Die fast farblosen seidenglänzenden Krystalle zeigten bei 120° getrocknet im geschlossenen Rohr erhitzt den Schmelzp. 269—272° und folgende spezifische Drehung in wässeriger Lösung:

0,5 g. Substanz in 15 ccm. Wasser gelöst. Concentration der Lösung 3,3. Drehung im 2-dm-Rohr bei 20° im Natriumlicht: — 2,41°.

$[\alpha]_D^{20^0} = -36{,}51^0$.

Kossel und Kutscher[1]) beobachteten für ein mehrfach umkristallisiertes Histidin $[\alpha]_D^{20} = -39{,}74^0$, so dass also das hier nach einem etwas abgeänderten Verfahren gewonnene Präparat schon nach einmaligem Umkrystallisieren als fast rein gelten kann.

Die Racemisierung des aktiven Histidins wurde anfangs nach dem Verfahren von Fränkel[2]) in der Weise vorgenommen, dass das wie beschrieben erhaltene Histidin-Chlorhydrat mit ca. 20% Salzsäure im geschlossenen Rohr 30 Stunden auf 160° erhitzt wurde. Hierbei trat indes stets starke Zersetzung der Substanz unter intensiver Dunkelfärbung der Lösung ein, so dass die Ausbeuten an Racemkörper meist nur gering waren.

Im Falle man bereits die freie Base zur Verfügung hat, scheint das bisher auf das Histidin nicht angewandte Verfahren der Racemisierung durch Erhitzen mit Baryt-

[1]) Ztschr. f. physiol. Chem. 28,382 (1899).
[2]) Chem. Centr. Blatt 1,2,1616 (1906).

wasser unter Druck wesentlich einfacher und bequemer sowie mit besseren Ausbeuten verbunden zu sein.

Zur Ausarbeitung dieser Methode wurden zunächst 4 g. Histidinbase im Porzellanbecher im Autoklaven in $^1/_2$ L. Wasser mit 10 g krystallisierten Baryts 5 Stunden auf 150° C. erhitzt. Das fast farblose Gemisch wurde vom Baryt durch genaues Ausfällen mit Schwefelsäure befreit und das Filtrat auf 100 ccm. eingedampft. Die Lösung weist noch deutliche, wenn auch schwache Drehung auf und zwar im 2 dm-Rohr bei 20°—0,79°. Nimmt man an, dass in der Flüssigkeit noch die ursprüngliche Menge von 4 g. Histidin vorhanden ist, so würde dies einer spezifischen Drehung von $[\alpha]_D^{20^0} = -9{,}9^0$ entsprechen. Da das reine l-Histidin die Drehung —39,74° zeigt, sind also 25% der Base noch aktiv geblieben.

Der Racemisierungsprozess wurde daher an dem ganzen sorgfältig gesammelten Gemisch fortgesetzt, indem man dasselbe weitere 5 Stunden mit 10 g. Baryt im Autoklaven wieder auf 150° erhitzte. Nach gleicher Behandlung wie oben zeigte die barytfreie Lösung auf 100 ccm. verdampft jetzt im 2-dm-Rohr eine Drehung von — 0,24°, was einem ungefähren Gehalt von 8% aktiver Base im racemisierten Produkt entsprechen würde.

Durch nochmaliges 5-stündiges Erhitzen mit Barytwasser auf 150° liess sich der Gehalt an aktivem Histidin auf ca. 1% herabdrücken.

Auf Grund dieser Versuche wurde dann die Racemisierung des Histidins allgemein durch 15—20-stündiges Kochen mit Barytwasser unter Druck bei 150—160° ausgeführt, wobei sich die racemische Base stets in farblosen Kristallen fast quantitativ gewinnen liess.

Vergärung del dl-Histidins.

1) 4 g. rac. Histidin wurden zusammen mit 200 g. Zucker in 2 L. Wasser gelöst und die schwach alkalische Lösung mit 100 g. frischer obergäriger Presshefe bei

Zimmertemperatur vergoren. Die Gärung setzte sehr schnell ein, worauf ebenfalls sehr bald eine Säuerung der Flüssigkeit eintrat. Nach 4 Tagen war der Zucker aus der Lösung verschwunden. Die durch Ton filtrierte hefefreie Flüssigkeit wurde mit Natriumkarbonat alkalisch gemacht und mit Sublimatlösung im Überschuss gefällt. Der durch mehrfaches Dekantieren mit Wasser gereinigte Niederschlag wurde in Wasser suspendiert, auf dem Wasserbad mit Schwefelwasserstoff zersetzt und nach Entferung des Quecksilbersulfids durch Kochen mit Bleioxyd entchlort. Das wieder mit Schwefelwasserstoff entbleite Filtrat behandelte man mit Kohle und dampfte es bis fast zur Trockne ein.

Die erhaltenen Kristalle wurden auf Ton getrocknet. Das so in einer Ausbeute von 1,25 g. gewonnene rohe d-Histidin liess sich durch zweimaliges Umlösen aus heissem Wasser fast völlig optisch rein gewinnen. Es besass alle Eigenschaften des natürlichen Histidins, nur sein Drehungsvermögen war entgegengesetzt. Die Menge des gereinigten im Vakuumexsiccator getrockneten Präparats betrug 0,34 g.

0,1049 g. Sbst: 24,6 ccm. N (21°,761 mm.)
Für Histidin: $C_6H_9N_3O_2$: Ber. N 27,10
(mol 155): Gef. N 27,26.

Für die optische Untersuchung diente die wässrige Lösung.

0,34 g. Substanz in 15 ccm. Wasser gelöst. Konzentration der Lösung 2,27. Drehung im 200 mm-Rohr bei 20° im Natriumlicht: + 1,72°.

Mithin spez. Drehung $[\alpha]_D^{20} = + 37,88°$.

Da Kossel und Kutscher für die natürliche Histidin-Base $[\alpha]_D^{20°} = - 39,74°$ angeben, ist also bei der Vergärung des rac. Histidins fast reines d-Histidin erhalten und damit zum ersten Mal der Antipode der in der Natur vorkommenden Aminosäure dargestellt worden.

Die geringe Reinausbeute an d-Histidin erklärt sich aus der Schwierigkeit der Trennung, von dem bei der Gärung aus Histidin nebenher entstehenden chemisch sich sehr ähnlich verhaltenden β-Imidazoläthylalkohol, bei dessen Anwesenheit die anfangs farblosen Histidin-Lösungen sich beim Eindampfen stets dunkel färben.

2) 10,3 g. rac. Histidin wurden mit 400 g. Zucker in 3 Liter Wasser gelöst und mit 200 g. Hefe vergoren. Die Gärung war bei Zimmertemperatur in 4 Tagen beendet. Aus der filtrierten alkalisch gemachten Flüssigkeit wurde das vergorene Histidin wie beschrieben mit Sublimat gefällt, der Niederschlag mit Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat mit Bleioxyd vom Chlor befreit und die schliesslich erhaltene gereinigte Flüssigkeit bis zur Krystallisation eingeengt. Es resultierte ein mit schmierenden Bestandteilen durchsetztes gefärbtes Rohprodukt in einer Menge von 5,5 g. Da sich durch Auskochen mit Alkohol eine Reinigung nicht erzielen liess und eine solche durch Umlösen aus Wasser zu verlustreich war, wurde die rohe Base durch Übergiessen mit Salzsäure und Eindampfen der Lösung in das Chlorhydrat verwandelt. Dieses liess sich durch mehrfaches Ausziehen mit Alkohol von dem anhaftenden Chlorid des Imidazoläthylalkohols trennen und wurde schliesslich als grauweisse Masse erhalten, die bei 2-maligem Umlösen aus heissem Wasser nach Behandlung mit Knochenkohle die typischen Kristallchen des mit einem Mol. Wasser kristallisierenden Histidinmonochlorids von der Formel $C_6H_9N_3O_2 \cdot HCl \cdot H_2O$ lieferte.

Zur Analyse wurde die Substanz im Vakuumexsiccator getrocknet.

0,0857 g. Sbst.: 14,8 ccm. N (21°,755 mm)
0,1047 g. Sbst.: 0,0710 g. AgCl.
Für $C_6H_9N_3O_2 \cdot HCl \cdot H_2O$: Ber. N 20,04; Cl 16,92.
(mol 209,5): Gef. N 19,92; Cl 16,77.

Die Substanz dreht in salzsaurer Lösung links:

0,5000 g. Substanz in 9,5 ccm. Wasser gelöst, das 3 mol. HCl enthielt. Drehung im 2-dm-Rohr bei 20° im Natriumlicht —0,83°, folglich

$$[\alpha]_D^{20^0} = -7{,}89^0.$$

Auf Dichlorid umgerechnet würde der Drehungswert $[\alpha]_D^{20^0} = -7{,}31^0$ betragen, während Kossel und Kutscher[1]) für die gleichen Bedingungen die spezif. Drehung des natürlichen Histidins: + 6,46° angaben. Die relativ geringe Differenz der beobachteten Zahlen erklärt sich vielleicht daraus, dass die genannten Forscher, soweit sich aus ihrer Arbeit ersehen lässt, bei der Berechnung den Kristallwassergehalt des Monochlorids nicht berücksichtigt haben.

Jedenfalls geht aus der Drehung des vergorenen Histidins zur Genüge hervor, dass die Spaltung der racemischen Base durch die Hefe vollständig verlaufen ist und dass es mit Hilfe dieser Methode leicht gelingt, den optischen Antipoden des natürlichen Histidins zu gewinnen.

Vergärung des rac. Alanyl-Glycins.

Zur Darstellung dieses Dipeptids wurde zunächst nach der Vorschrift von E. Fischer[2]) α-Brompropionylglycin bereitet. Aus 20 g. Glycin und 68 g. Brompropionylbromid erhielt man 45 g. dieses Körpers. Das Brompropionylglycin wurde ebenfalls nach der Angabe von E. Fischer[3]) durch 2-tägiges Stehenlassen mit überschüssigem 25%igen Ammoniak bei gewöhnlicher Temperatur in Alanylglycin verwandelt. Die Ausbeute an Dipeptid aus 45 g. des Bromkörpers betrug 26,5 g. Das Präparat zeigte den von Fischer angegebenen Schmelzpunkt und war frei von Brom und Ammoniak.

[1]) Ztschr. f. physiol. Chem. 28,382 (1899).

[2]) E. Fischer, Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine S. 467.

[3]) Ibidem, S. 341.

10 g. des so erhaltenen Alanyl-Glycins wurden mit 500 g. Raffinade in 4 Liter Leitungswasser gelöst und mit 250 g. frischer obergäriger Presshefe Rasse XII in der üblichen Weise vergoren. Die Gärung war in 3 Tagen beendet. Die Flüssigkeit wurde darauf durch Ton klar filtriert, das Filtrat auf dem Dampfbade bis auf $^3/_4$ Liter eingedampft, mit überschüssigem Kupfercarbonat gekocht, die blaue filtrierte Lösung zum Syrup eingeengt, der mit Methylalkohol verrührt wurde. Von dem entstandenen Niederschlage filtrierte man ab, verdampfte das Filtrat vollständig und zog den Rückstand wiederholt mit gewöhnlichem Alkohol aus, wobei blaugrün gefärbte Flocken ungelöst blieben. Aus dem intensiv-dunkelblauen Filtrat wurde der Alkohol verdampft, der Rückstand mit heissem Wasser aufgenommen und die Lösung mit Schwefelwasserstoff vom Kupfer befreit. Der überschüssige Schwefelwasserstoff wurde aus dem Filtrat durch einen CO_2-Strom verjagt und die vom ausgeschiedenen Schwefel getrübte Flüssigkeit im Vakuum bei 40° bis auf ca. 400 ccm. eingeengt, mit Kohle bei derselben Temperatur behandelt und das klare Filtrat (das im 200mm-Rohr 0,2° Saccharose nach links dreht) im Vakuum wieder bei der angegebenen Temperatur bis auf ein kleines Volum eingeengt. Die zurückbleibende Masse wurde, da das Peptid in Wasser spielend leicht löslich ist, mehrmals mit absoluten Alkohol übergossen und die Lösung im Vakuum abgedampft.

Die Isolierung des unvergorenen Dipeptids aus dem sirupösen Rückstand bot ziemliche Schwierigkeiten, da durch die Fällung mit absolutem Alkohol immer auch gewisse hygroskopische Substanzen aus der Hefe mit niedergerissen wurden. Durch vorsichtige fraktionierte Fällung mit absol. Alkohol gelang es schliesslich nach Entfernung von schmierenden, an der Glaswand haftenden Verbindungen ein gelbliches sandiges Pulver von den Eigenschaften des Dipeptids in einer Ausbeute von 2,4 g zu isolieren. Die Substanz wurde zur vorläufigen Be-

stimmung der Drehung direkt in Wasser gelöst, die Lösung mit etwas Kohle geschüttelt und filtriert. Das Filtrat auf 50 ccm. concentriert zeigte im 2dm. Rohr eine Rotation von — 1,2° im Natriumlicht, folglich

$$[\alpha]_D^{20^0} = -12{,}5^0.$$

Zur weiteren Reinigung wurde die wässerige Lösung der Substanz im Vakuum vorsichtig auf ein Volumen von ca. 10 ccm. eingedampft und der so erhaltene Syrup mit 100 ccm. heissen absoluten Alkohol versetzt. Es schied sich dabei ein kristallinischer sandiger Niederschlag von schwacher Gelbfärbung ab, dessen Menge im Vakuum getrocknet 2,0 g. betrug. Zur Bestimmung der spez. Drehung wurden 1,4 g. Substanz in 10 ccm. Wasser gelöst. Die Drehung im 100 mm.-Rohr bei 20° im Natriumlicht ist: 1,96° nach links, daraus

$$[\alpha]_D^{20^0} = -14{,}0^0.$$

Da die Drehung des l-Alanyl-Glycins nach E. Fischer[1]: $[\alpha]_D^{20^0} = -48{,}6^0$ beträgt, muss man also annehmen, dass das durch Gärung gewonnene Dipeptid aus einem Gemisch des racemischen und aktiven Alanyl-Glycins besteht und zwar ca. 30% l-Alanyl-Glycin enthält.

Wie indes die Elementaranalyse und die Aschenbestimmung zeigte, war das erhaltene Produkt auch durch mehrmaliges Umlösen nicht vollkommen zu reinigen, sondern enthielt offenbar noch geringe Mengen aus der Hefe in Lösung gegangene Substanzen, wahrscheinlich Alkalisalze organischer Säuren, die ebenfalls durch Alkohol gefällt werden und infolge der ungemein leichten Löslichkeit des Peptids bisher nicht davon getrennt werden konnten.

Zur weiteren Reinigung wurde die wie oben beschrieben erhaltene Substanz (2,0 g.) noch einmal in

[1]) E. Fischer, Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine (1899—1906). S. 497.

wenig Wasser gelöst und mit heissem absolutem Alkohol gefällt. Der fast farblose sandige Niederschlag (1,5 g.) schmolz bei raschem Erhitzen gegen 235°, also fast wie der Racemkörper, aber noch erheblich niedriger als die von E. Fischer auf chemischem Wege erhaltene optisch aktive Verbindung, welche bei 256° schmilzt[1]). Zur Analyse wurde die Substanz bei 100° getrocknet.

0,1268 g. Sbst. gaben 19,7 ccm. Stickstoff über 50% KOH bei 19° und 756 mm.

Für Alanyl-Glycin: Ber. N 19,26

$C_5H_{10}N_2O_3$ (mol 146) Gef. N 17,83.

Die Substanz wurde auf dieselbe Weise wie oben angegeben noch 2 mal gelöst und gefällt und die erhaltenen 0,75 g. zur Stickstoff- und Drehungsbestimmung angewandt.

0,1518 g. Sbst. gaben 24,0 ccm. Stickstoff über 50% KOH bei 21° und 758 mm. Druck.

Für Alanyl-Glycin: Ber. N 19,26

$C_5H_{10}N_2O_3$ (mol 146): Gef. N 18,31.

Spez. Drehung in wässeriger Lösung: 0,5 g. Substanz in 5,0 ccm. Wasser gelöst. Drehung im 100 mm-Rohr bei 20° im Natriumlicht: — 2,30°, also

$[\alpha]_D^{20°} = -23{,}0°$. (E. Fischer[1]): $[\alpha]_D^{20°} = -48{,}6°$.)

Die Substanz wurde schliesslich zum 5-ten Mal nach demselben Verfahren gereinigt und zur Analyse bei 100° getrocknet.

0,2215 g. Sbst. gaben 34,8 ccm. Stickstoff über 50% KOH bei 20° und 759 mm.

Für Alanyl-Glycin: Ber. N 19,26

$C_5H_{10}N_2O_3$ (mol 146) Gef. „ 18,28

Aschenbestimmung: 0,0997 g. Substanz hinterliessen beim Glühen 0,0024 g. Asche. Mithin enthält die Substanz 2,4% Asche.

[1]) E. Fischer, Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine (1899—1906) S. 496.

Wenn es demnach auch nicht gelang durch Hefegärung das vollkommen reine aktive Dipeptid zu erhalten, so zeigen doch die Drehungsbestimmungen, die ein allmähliches Aufsteigen der spezifischen Drehung bei weiterer Reinigung des vergorenen Körpers deutlich erkennen lassen, zur Genüge, dass das racemische Alanyl-Glycin von der Hefe asymmetrisch gespalten, und dass dabei vorzugsweise die d-Verbindung angegriffen wird.

Die Vergärung der racemischen α-Pyrrolidincarbonsäure (Prolin).

1 Kg. Gelatine Kahlbaum („Silberdruck") wurde nach dem Verfahren von E. Fischer[1]) durch 6-stündiges Kochen mit 3 Liter koncentrierter Salzsäure am Rückflusskühler hydrolysiert. Das daraus erhaltene Aminosäuregemisch wurde ebenfalls nach den Angaben E. Fischers durch gasförmige Salzsäure verestert und die aus den Chlorhydraten freigemachten Ester unter vermindertem Druck abdestilliert. Die zwischen 40—120° C. bei einem Druck von 13—17 mm. übergehenden Aminosäurenester (230 g.) wurden mit Wasser am Rückflusskühler bis zum Verschwinden der alkalischen Reaktion gekocht, die Lösung verdampfte und der Rückstand (ca. 150 g.) dreimal mit je einem Liter absoluten Alkohol ausgekocht. Die alkoholischen Auszüge wurden nach dem Einengen auf ein kleines Volumen zur Fällung des Prolins mit viel Äther versetzt und der erhaltene krystallinische Niederschlag zur Racemisierung der Säure 5 Stunden mit Barytwasser im Autoklaven auf 145° erhitzt. Es wurden auf diese Weise ca. 40 g. racemisches Prolin gewonnen, das man durch 2 maliges Lösen in Alkohol und Fällen mit Äther reinigte. Die bei 110° getrocknete Substanz schmolz in offener Kapillare bei 200—205° (E. Fischer bei 203—206°).

Zur Kontrolle wurde noch eine Probe der erhaltenen Säure in das Kupfersalz verwandelt und der Kupfergehalt desselben bestimmt.

---

[1]) Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine. S. S. 672 und 279.

0,3848 g. Substanz (bei 110° getrocknet) hinterliessen beim Glühen 0,1068 g. CnO

Für Prolin-Kupfer: $C_{10}H_{16}O_4N_2Cn$

Ber. Cn 21,81%

Gef. „ 22,18%

Gärversuche:

1) 6,0 g. dl-Prolin wurden mit 250 g. Zucker in $2^1/_2$ Liter Leitungswasser gelöst und mit 100 g. frischer obergäriger Presshefe Rasse XII in üblicher Weise vergoren. Nach 3-tägiger beendeter Gärung wurde das zuckerfreie Filtrat auf ca. $^3/_4$ Liter eingedampft und mit Kupfercarbonat im Überschuss gekocht. Die tiefblaue Lösung ergab bei weiterem Einengen die typischen schön blauen Kriställchen des Prolins, die abfiltriert und im Exsiccator getrocknet wurden. Bei vollständiger Aufarbeitung der Mutterlauge betrug ihre Gesamtmenge 3,5 g. Durch Zersetzung mit Schwefelwasserstoff wurden daraus 2,6 g. reine Aminosäure isoliert. Aus der so gewonnenen Substanz wurde eine 20%ige wässerige Lösung hergestellt. Dieselbe erwies sich bei der Beobachtung im 2 dm-Rohr als optisch völlig inaktiv.

2) 7 g. dl-Prolin wurden zusammen mit 800 g. Raffinade in 3 Liter Wasser gelöst und mit 200 g. frischer Presshefe vergoren. Die im Verlaufe von 4 Tagen vollständig vergorene zuckerfreie Flüssigkeit wurde wie vorher angegeben auf das Kupfersalz des Prolins verarbeitet. Gewinnen liessen sich 3,6 g. kristallisiertes Prolinkupfer, aus dem 2,5 g. Aminosäure isoliert wurden. Auch diese Substanz zeigte in 10%iger Lösung im 2 dm-Rohr untersucht keine Spur einer Drehung.

Da reines aktives Prolin in wässeriger Lösung nach E. Fischer $[\alpha]_D^{20^\circ} = -77{,}40^\circ$ zeigt und deshalb auch eine partielle Aktivierung der Aminosäure der Beobachtung nicht hätte entgehen können, und da andererseits jedesmal ungefähr 60–65% der angewandten Aminosäure

bei der Gärung aus der Lösung verschwunden sind, so ergibt sich aus den beiden Gärversuchen deutlich, dass beide Komponenten des dl-Prolins durch die gärende Hefe gleichmässig angegriffen sind.

Verhalten des aktiven Prolins gegen Säuren unter den Bedingungen der Eiweisshydrolyse.

1,35 g. aktives Prolin aus Gelatine wurden in 150 ccm. 33%iger Schwefelsäure, d. h. in einer Concentration, wie sie für die Eiweisshydrolyse benutzt wird, gelöst. Die Lösung drehte im 200mm-Rohr 0,34° nach links. Sie wurde 24 Stunden am Rückflusskühler gekocht und nach dem Abkühlen wieder polarimetrisch untersucht. Die Flüssigkeit zeigte unverändert dasselbe Drehungsvermögen. Es hat also durch das Kochen mit Säure keine Racemisierung der Aminosäure stattgefunden, auch nicht partiell.

Die Vergärung der racemischen Asparaginsäure.

Zur Darstellung der dl-Asparaginsäure wurde bisher gewöhnlich der aktive Körper mit Salzsäure im zugeschmolzenen Rohr auf höhere Temperatur erhitzt. Es wurden zunächst Versuche angestellt, ob sich die Racemisierung nicht bequemer und mit besserer Ausbeute durch Erhitzen mit Barytwasser im Autoklaven ausführen lässt. Als Ausgangsmaterial diente dabei reine aktive l-Asparaginsäure (Kahlbaum). Vielfache Versuche zeigten denn auch, dass man diese Aminosäure am besten vollständig racemisieren kann, wenn man sie mit überschüssigem Barytwasser 10 Stunden im Autoklaven auf 145° erhitzt. Die Ausbeute beträgt dabei aber nur ungefähr 40%, was daher rührt, dass die Aminosäure offenbar noch in anderer Richtung zersetzt wird.

Gärversuche:

1.) 5,2 g. dl-Asparaginsäure wurden mit 200 g. Zucker in 2 Liter Leitungswasser gelöst und die Lösung in einem 3-L.-Kolben mit 100 g. frischer Presshefe in üblicher

Weise vergoren Nach 3 Tagen war die Gärung beendet. Die Flüssigkeit wurde durch Ton filtriert und auf ein kleines Volumen eingedampft, wobei sich Krystalle abschieden, die abfiltriert, gewaschen und auf Ton getrocknet wurden. Ihre Menge betrug nach vollständiger Aufarbeitung der Mutterlauge im Ganzen 3,2 g.

Die schon fast farblosen Kristalle wurden zur völligen Reinigung aus Wasser umkristallisiert.

Spez. Drehung in wässeriger Lösung:

Angewandt: 0,2018 g. Substanz in 40 ccm. Wasser. Drehung im 200 mm-Rohr $\pm$ 0,0°.

Spez. Drehung in Salzsäure.

a) Angewandt: 0,30 g. Substanz in 16 ccm. 10%-iger Salzsäure. Drehung im 200 mm-Rohr = $\pm$ 0,0°.

b) Angewandt: 0,30 g. Substanz in 3 mol. Salzsäure. Gesamtgewicht der Lösung 8,0 g. Prozentgehalt 3,75. Drehung im 200 mm-Rohr bei 20° = $\pm$ 0,0°.

Die zurückgewonnene Substanz war also optisch vollkommen inaktiv.

Nach E. Fischer[1]) hätte optisch reine d-Asparaginsäure in 3 mol. HCl die spez. Drehung $[\alpha]_D^{20^0} = -25{,}5^0$ zeigen müssen.

2) 7 g. dl-Asparaginsäure wurden mit 300 g. Zucker in $2^1/_2$ Liter Leitungswasser gelöst und mit 150 g. frischer obergäriger Hefe Rasse XII im Laufe von 4 Tagen vergoren. Das Filtrat von der Hefe lieferte beim Verdampfen einen Syrup, der auch beim längeren Stehen unter Abkühlung nicht kristallisierte. Durch Kochen mit Kupfercarbonat wurde nur eine grünliche Lösung erhalten, während bei Anwesenheit auch nur von Spuren Aminosäure dieselbe deutlich blau hätte gefärbt sein müssen. Dementsprechend liess sich auch beim Verdampfen des Filtrats vom Kupfercarbonat kein Kupfer-

[1]) Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine. S. 100.

salz abscheiden. Die racemische Aminosäure war also durch die Hefegärung vollständig aus der Lösung verschwunden.

Die beiden Gärversuche beweisen demnach mit Sicherheit, dass die racemische Asparaginsäure, ebenso wie das Prolin symmetrisch von der Hefe angegriffen und dass beide Stereoisomeren gleichmässig von ihr ausgenutzt werden.

Verhalten der aktiven Asparaginsäure gegen Mineralsäuren unter den Bedingungen der Eiweisshydrolyse.

2,0 g. l-Asparaginsäure wurden in 150 ccm. 30%-iger Schwefelsäure gelöst. Die Lösung zeigte im 2-dm-Rohr eine Polarisation von 0,65° nach rechts. Sie wurde 24 Stunden rückfliessend gekocht. Die Drehung blieb unverändert dieselbe.

Es findet also auch hier scheinbar keine Racemisierung der aktiven Aminosäure durch Kochen mit Säuren statt.

Vergärung des racemischen Tyrosins.

Zur Racemisierung wurden 12 g. reines l-Tyrosin aus Eiweiss mit 60 g. Baryt 20 Stunden im Autoklaven auf 160—170° erhitzt[1]). Aus der erhaltenen Lösung wurde der Baryt nicht wie üblich mit Schwefelsäure gefällt, wobei stets grosse Quantitäten Tyrosins mitgerissen werden, sondern es wurde überhaupt auf die Fällung verzichtet und die Flüssigkeit bis zur schwachsauren Reaktion mit Essigsäure versetzt. Dabei fiel das Tyrosin schon ziemlich rein aus, während der Baryt in Lösung blieb. Zur weiteren Reinigung wurde die Kristallmasse in wenig Salzsäure enthaltendem Wasser gelöst, die Lösung mit Ammoniak schwach alkalisch gemacht und dann mit Essigsäure ganz schwach angesäuert. Das ausfallende

[1]) E. Fischer, Untersuchungen über Arminosäuren, Polypeptide und Proteine S. 653.

Tyrosin wurde wiederholt mit Wasser ausgewaschen und bei 110° getrocknet.

Ausbeute 10 g. Die 4%-ige Lösung der Aminosäure in 20%-iger Salzsäure zeigte im 2-dm-Rohr untersucht keine Rotation.

Gärversuch.

9 g. dl-Tyrosin wurden zusammen mit 600 g. Raffinade in 7 Liter Wasser unter Kochen gelöst und die abgekühlte Lösung, aus der sich nichts ausschied, auf 2 Flaschen gleichmässig verteilt. Die Flüssigkeit wurde im ganzen mit 300 g. Hefe vergoren. Die Gärung verlief sehr intensiv und war bereits nach 2 Tagen beendet. Das zucker- und hefefreie Filtrat wurde bis zum Syrup eingedampft. Auch bei starker Eiskühlung liessen sich daraus keine Krystalle isolieren. Auch gab eine Probe des Syrups mit Kupfercarbonat gekocht keine Blaufärbung.

Da eine Ausscheidung des Tyrosins selbst aus der Lösung bei der Gärung nicht beobachtet wurde, so muss man annehmen, dass die Hefe die vorgelegte Menge Tyrosin quantitativ aufgenommen und dabei beide Komponenten, die d- und l-Verbindung, gleichmässig assimiliert hat. Dieser Befund ist analog demjenigen von G. Bertrand[1]), der ebenfalls beobachtete, dass das Enzym, die Tyrosinase, beide Raumformen des Tyrosins symmetrisch angreift, so dass die jedesmal zurückbleibende Aminosäure inaktiv ist.

Dass tatsächlich bei der Vergärung mit Hefe das racemische Tyrosin abgebaut worden ist, liess sich durch Isolierung entsprechender Mengen des von F. Ehrlich[2])

[1]) G. Bertrand und M. Rosenblatt. Compt. rend de l'Acad. des Sciences **146**,304 (1908).

[2]) Ueber die Bedingungen der Fuselölbildung und über ihren Zusammenhang mit dem Eiweissaufbau der Hefe. Ber. **40**,1027 (1907). Ueber die chemischen Vorgänge des pflanzlichen Eiweissstoffwechsels. „Landwirtschaftliche Jahrbücher". Ergänzungsband **5**,306 -7 (1909).

entdeckten Gärproduktes des Tyrosins, des sehr charakteristischen p-Oxyphenylaethylalkohol von der Formel: $C_6H_4(OH)\cdot CH_2\cdot CH_2OH$ zeigen.

Zu diesem Zweck wurde der wie erwähnt beim Verdampfen verbleibende Sirup mit Natriumcarbonat schwach alkalisch gemacht und im Zelmanowitz'schen Apparat 5 Tage erschöpfend viel mit Äther extrahiert. Die verdampfte ätherische Lösung hinterliess einen gelblichen Syrup, der beim Reiben kristallinisch erstarrte. Die Menge der beim Trocknen auf Ton erhaltenen Kristalle betrug 2,8 g. Sie wurden zur Reinigung in Äther gelöst und die Lösung mit Ligroin bis zur Trübung versetzt. Es kristallisierten feine mattglänzende schwachgelblich gefärbte Blättchen, die im Exsiccator getrocknet bei 92,5° schmolzen. Sie zeigten also denselben Schmelzpunkt, wie ihn F. Ehrlich angegeben hat, und besassen auch sonst die Eigenschaften des von ihm kurz beschriebenen p-Oxyphenylaethylalkohols. Charakteristisch ist besonders für diesen Alkohol, dass er sich in Äther und in Wasser spielend leicht löst, dass er ferner die typische Millonsche Reaktion gibt und schon in kleinsten Mengen intensiv bitter schmeckt.

Die Vergärung ist also auch beim racemischen Tyrosin nach der Gleichung:

$$C_6H_4(OH)CH_2\cdot CH(NH_2)CO_2H + H_2O =$$
$$= C_6H_4(OH)\cdot CH_2\cdot CH_2OH + CO_2 + NH_3.$$

verlaufen.

Ich habe dann noch versucht, durch Oxydation des p-Oxyphenylaethylalkohols zur entsprechenden Säure, der Oxyphenylessigsäure, zu gelangen. Die Versuche blieben trotz vielfacher Abänderung erfolglos.

Bei der Einwirkung von Wasserstoffsuperoxyd in essigsaurer oder in Natriumcarbonat-alkalischer Lösung wurde jedesmal der Alkohol unverändert zurückgewonnen. Zwar wirkte Permanganat in saurer Lösung stark oxydierend, doch liessen sich dabei nur schwach gelbliche nicht näher zu identifizierende Flocken abscheiden. Wahr-

scheinlich verläuft in diesem Falle die Oxydation weitergehend unter Aufspaltung des Benzolringes, da die schliesslich erhaltene Lösung die Millonsche Reaktion nicht mehr gab.

Vergärung des Histidins durch Hefe zu β-Imidazolaethylalkohol.

Da nach F. Ehrlich[1]) die α-Aminosäuren durch Hefe stets in dem Sinne vergoren werden, dass dabei die entsprechenden um ein C-Atom niedrigeren Alkohole entstehen, so war auch zu erwarten, dass in dem Falle der schon früher beschriebenen Vergärung des Histidins ein Abbau der Aminosäure zufolge der Gleichung

$$C_3H_3N_2 \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2)CO_2H + H_2O =$$
$$= C_3H_3N_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2OH + NH_3 + CO_2$$

zu dem Imidazolaethylalkohol erfolgt.

Die nachstehenden Versuche scheinen diese Annahme zu bestätigen.

30 g. Histidinchlorhydrat aus Pferdeblut wurden durch Kochen mit Bleioxyd entchlort und die Lösung mit Schwefelwasserstoff entbleit. Das nach der Behandlung mit Kohle schwach gefärbte Filtrat, das ungefähr 20 g. freier Histidinbase enthielt, wurde mit ungefähr 10 Liter Wasser verdünnt, darin 2 kg. Zucker aufgelöst und die ganze Lösung mit 1 kg. frischer Presshefe vergoren.

Nach 3 Tagen war die Gärung beendet und der Zucker aus der Lösung verschwunden. Die durch Ton filtrierte klare Flüssigkeit wurde nunmehr mit Natriumcarbonat alkalisch gemacht und mit wässeriger 10%-iger Sublimatlösung versetzt. Die über dem entstandenem weissgrauen Niederschlage befindliche Flüssigkeit wurde abgehebert und die Fällung selbst mehrmals mit Wasser dekantiert. Der in Wasser suspendierte Niederschlag wurde schliesslich in der Wärme mit Schwefelwasserstoff

[1]) Ber. **40**,1047 (1907). — F. Ehrlich, Ueber die chemisehen Vorgänge des pflanzlich. Eiweissstoffwechsels. „Landwirtschaftl. Jahrbücher", Ergänzungsb. **5**,305-6 (1909).

zersetzt und das Filtrat vom Schwefelquecksilber nach Klären mit Knochenkohle unter vermindertem Druck bei 50% zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde mit absolutem Alkohol aufgenommen und sehr vorsichtig im Vakuum abgedampft. Dieser Prozess wurde 4 mal wiederholt, wobei jedesmal beim Lösen in absol. Alkohol dunkelgefärbte Bestandteile ungelöst blieben. Schliesslich wurde eine gelatineartige durchsichtige gelbbraune Masse erhalten, die durch Schütteln mit absol. Alkohol unter nur geringer Trübung sich löste. Die von der Trübung abfiltrierte tiefbraun gewordene Flüssigkeit wurde mit Äther gefällt. Die schnell abgesaugte Fällung bildete zunächst eine spielend leicht in Wasser und Alkohol lösliche farblose Masse, die sich an der Luft sowohl wie im Vakuumexsiccator sehr schnell dunkelfärbte und zerfloss. Dass es sich hier um das Chlorhydrat eines dem Histidin nahestehenden Abbauproduktes dieser Aminosäure handelte, ging daraus hervor, dass die Verbindung mit Silbernitrat nachweisbares Chlor enthielt, und dass ihre Lösung mit Diazobenzolsulfosäure[1]) eine intensive Rotfärbung ergab, während die Substanz die dem Histidin eigene Knoopsche Reaktion nicht zeigte, sondern mit Bromwasser nur eine weingelbe Färbung lieferte. Es sei bemerkt, dass das dem Alkohol naheverwandte Imidazoläthylamin nach F. Knoop[2]) mit Bromwasser auch eine Rotfärbung ergibt, wenn auch die Farbe der Lösung von der durch Histidin erzeugten etwas abweicht.

Von weiteren Reaktionen der an der Luft sehr unbeständigen Substanz sei erwähnt, dass ihre Lösung mit Nesslers Reagenz anfangs eine schwache rotviolette Färbung gibt, die bald verschwindet, worauf die Abscheidung von braunen Flocken erfolgt. Fehlingsche Lösung wird nicht reduziert. Mit Pikrinsäurelösung bilden sich Öltröpfchen, die nicht erstarren. Beim Erhitzen der Sub-

[1]) H. Pauly. Chem. Centr.-Blatt 2,1289 (1904).

[2]) Hofmeisters Beitr. 11,7—9 (1908). — Chem. Centr.-Blatt 1,2,2208 (1908).

stanz auf dem Platinblech tritt starkes Aufblähen ein, und es entwickelt sich ein eigentümlicher Geruch. Die Substanz hinterliess beim Glühen geringe Mengen chlorfreier Asche.

Infolge der ungemein leichten Zerfliesslichkeit war eine Analyse mit der Substanz nicht ausführbar.

Genau so wie das Chlorhydrat verhielt sich die daraus mit Bleioxyd freigemachte Base. Sie bildete ebenfalls eine gummiartige an der Luft und auch im Vakuumexsiccator schnell sich zersetzende und zerfliessliche Masse, die dieselben Reaktionen wie das Chlorhydrat gab, aber nicht zur Analyse gebracht werden konnte.

Die einzige schwerlösliche Verbindung, die für die weitere Untersuchung des Gärproduktes zu gewinnnen war, bildete ein Platinsalz anormaler Zusammensetzung. Säuert man die Lösung des wie beschrieben isolierten Chlorhydrats mit Salzsäure stark an und fügt hierzu Platinchloridlösung, so findet überhaupt keine Abscheidung eines Salzes statt. Erst nach sehr langer Zeit fallen aus einer solchen Lösung schmutzigbraune Flocken aus. Die Isolierung eines Platinats gelang erst auf Grund der Beobachtung, dass bei der Bereitung des Salzes auch der geringste Überschuss von Salzsäure zu vermeiden ist. Am besten verfährt man, wenn man zu der Lösung des Chlorhydrats direkt, ohne weiter anzusäuern, Platinchloridlösung in geringem Überschuss hinzugefügt. Es fällt dabei sofort ein orangegelber in Wasser, Alkohol und auch in Salzsäure unlöslicher Niederschlag aus, der mit Wasser und Alkohol gewaschen und zur Analyse bei 110° getrocknet wurde. Die Platin-Bestimmung ergibt, dass es sich hier sehr wahrscheinlich um ein Semi-Platinat des Imidazoläthylalkohols von der Formel:

$C_{10}H_{16}N_4O_2 \cdot PtCl_2$ handelt.

0,3180 g. Substanz ergaben beim Glühen 0,1280 g. Pt

Für $C_{10}H_{16}N_4O_2PtCl_2$: Ber. Pt 39,80

(mol 490): Gef.: Pt 40,25.

Versuche ein normales Salz von der Zusammensetzung $C_{10}H_{18}N_4O_2$ Pt Cl_6 zu erhalten, misslangen vollständig.

Die leichte Neigung des Imidazoläthylalkohols ein Semiplatinat der ermittelten Zusammensetzung zu liefern ist leicht erklärlich, da auch ähnliche ringförmige Verbindungen, wie z. B. Pyridin, Pyrazin, Dimethylpyrazin, Pyrazol und auch die Muttersubstanz dieser Verbindung, das Imidazol, unter gleichen Bedingungen vorwiegend analog zusammengesetzte Platinate bilden. (Siehe Beilstein 4,496—500).

Diese Arbeit wurde auf Anregung von Prof. Dr. F. Ehrlich und unter seiner Leitung in der Zeit vom Mai 1908 bis September 1909 im Institut für Zuckerindustrie zu Berlin ausgeführt, und im Sommersemester 1910 im Landwirtschaftlich-Technologischen Institut der Universität Breslau vollständig abgeschlossen. Es ist mir eine angenehme Pflicht, meinem hochverehrten Lehrer Herrn Prof. Dr. F. Ehrlich, Direktor des Landwirtschaftlich-Technologischen Instituts der Universität Breslau, an dieser Stelle für das mir stets bewiesene Wohlwollen sowie für die Förderung meiner Studien und das ausserordentliche Interesse, welches er mir gegenüber bekundete, meinen wärmsten Dank auszusprechen.

Zu verbindlichstem Dank bin ich auch dem Vorstand des Institus für Zuckerindustrie, Herrn Prof. Dr. A. Herzfeld, für sein freundliches Entgegenkommen, verpflichtet.

Lebenslauf.

Am 10. September 1876 wurde ich, Loser Zamkow, als Sohn des Hausbesitzers Michael Zamkow zu Wladislawow-Russland geboren.

Das Gymnasium habe ich zuerst in Mariampol und nachdem in Ananiew (Süd-Russland) besucht, wo ich auch mein Abiturientenexamen machte. Anfangs widmete ich mich dem Studium der Pharmacie, später studierte ich Naturwissenschaften und Chemie an der Landwirtschaftlichen Hochschule und Universität Berlin, zuletzt an der Universität Breslau, wo ich auch am 25. Januar 1911 das Rigorosum bestanden habe. Ich bin jüdischer Religion und russischer Staatsangehöriger.

Während meiner Studienzeit hörte ich die Vorlesungen folgender Herren Professoren und Dozenten, denen ich zu grossem Danke verpflichtet bin:

Börnstein, Buchner, Kny, Orth, Lehmann, Sering, Bortkiewicz, Hertwig, Engelmann†, Döring, Foerster, Lasson, Fritsch, E. Fischer, van't Hoff, Simmel, Dessoir, F. Ehrlich, Frech, Hintze.

Als Prüfungskommissare fungierten die Herren Geh. Regierungsrat Prof. Dr. Buchner (Chemie), Prof. Dr. Pfeiffer (Agriculturchemie), Geh. Regierungsrat Prof. Dr. Hintze (Mineralogie) und Prof. Dr. Frech (Geologie). Ich bin den genannten Herren zu weitgehendstem Danke verpflichtet.